

# Bioformulado de *Beauveria bassiana* (ATCC MYA-4886) y *Trichoderma lignorum* (ATCC-8751) como biocontrolador de *Atta cephalotes*\*

## Fabián Felipe Fernández Daza

Profesor de la Institución Universitaria Antonio José Camacho – UNIAJC, Cali - Colombia  
fabian.felipe.fernandez@correounivalle.edu.co  <https://orcid.org/0000-0002-9125-705X>

## Iván Darío López Villalobos

Profesor de la Institución Universitaria Antonio José Camacho – UNIAJC, Cali - Colombia  
idaniolopez@admon.uniajc.edu.co  <https://orcid.org/0000-0001-9513-7162>

## James Frank Trujillo Perdomo

Profesor de la Institución Universitaria Antonio José Camacho – UNIAJC, Cali - Colombia  
jfrujillo@admon.uniajc.edu.co  <https://orcid.org/0000-0001-5202-5371>

## Marney Pascoli Cereda

Profesor de la Universidad Católica Dom Bosco - UCDB, Campo Grande - Mato Grosso del Sur - Brasil  
cereda@ucdb.br  <https://orcid.org/0000-0002-8181-7754>

## Raul Alberto Cuervo Mulet

Investigador Asociado y Profesor de la Universidad San Buenaventura Cali, Cali - Colombia  
racuervo@usb.edu.co  <https://orcid.org/0000-0002-0182-0161>

## RESUMEN

**I.** La hormiga arriera está asociada a pérdidas en el sector agrícola, debido a su actividad defoliadora. El control de la especie se ha venido realizado artesanal, química y biológicamente, esta última con beneficios ambientales y de bajo riesgo para la salud humana. El objetivo de esta investigación fue desarrollar una formulación biológica para el control de la hormiga arriera (*Atta cephalotes*) utilizando una mezcla de esporas de dos hongos filamentosos (*Beauveria bassiana* y *Trichoderma lignorum*). **M.** Se desarrollaron 5 formulaciones empleando las relaciones: 1:1,6:4,4:6,3:7,2:8, de cepas de *B. bassiana* (ATCC MYA-4886) y *T. lignorum* (ATCC 8751), realizándoles prueba de viabilidad, patogenicidad y pureza. La colonización de las esporas en tejidos, se evaluó mediante la exposición de ratas Wistar a la formulación y sus componentes, realizando diagnóstico veterinario (disección) y cultivo microbiológico. **R.** Las formulaciones presentaron viabilidad a 24 h del 95+2%, el 100% de las formulaciones no se contaminaron después de 10 días, las formulaciones 6,4, 1:1,2:8 infectaron la totalidad de los individuos en 6 días, las formulaciones 4:6 y 3:7 a los 8 días, no se observó colonización de las cepas en la formulación, ni en tejidos de los biomodelos. **C.** Las formulaciones 6,4, 1:1, 2:8 de *Beauveria bassiana* y *Trichoderma lignorum*, poseen mayor actividad infecciosa sobre la hormiga arriera (*Atta cephalotes*).

## PALABRAS CLAVE

Hongo entomopatógeno, control biológico, hormiga arriera, *Beauveria bassiana*, *Trichoderma lignorum*

Recibido: 28/02/2018 Aceptado: 05/05/2018

\* Esta investigación financiada por Colciencias y la UNIAJC, muestra la formulación de un bioinsecticida para el control de hormiga arriera, a partir de esporas fúngicas, y la evaluación de la patogenicidad en modelos murinos, describiendo el efecto de este en tejido y crecimiento.

<http://dx.doi.org/10.18041/1900-3803/entramado.1.5417> Este es un artículo Open Access bajo la licencia BY-NC-SA (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>) Publicado por Universidad Libre - Cali, Colombia.

**Cómo citar este artículo:** FERNÁNDEZ-DAZA, Fabián Felipe; LÓPEZ-VILLALOBOS, Iván Darío; TRUJILLO-PERDOMO, James Frank; PASCOLI-CEREDA, Marney; CUERVO-MULET, Raul Alberto. Bioformulado de *Beauveria bassiana* (ATCC MYA-4886) y *Trichoderma lignorum* (ATCC-8751) como biocontrolador de *Atta cephalotes*. En: Entramado. Enero - Junio, 2019. vol. 15, no. 1, p. 288-296 <http://dx.doi.org/10.18041/1900-3803/entramado.1.5417>



## Bioinsecticide study for controlling the carrier ant (*Atta cephalotes*), using filamentous fungi spores *Beauveria bassiana* (ATCC MYA-4886) and *Trichoderma lignorum* (ATCC-8751)

### ABSTRACT

I. The Leaf cutting Ant is associated with losses in the agricultural sector; for the most part in the cultivation of citrus fruit sector; due to its activity defoliator. Control of the species has been handmade, chemical and biologically, the latter with environmental benefits and low risk to human health. This research had as objective develop a formulation biological for the control of the Leaf cutting Ant (*Atta cephalotes*) using a mixture of spores of two fungi filamentous (*Beauveria bassiana* and *Trichoderma lignorum*). **M.** He was the isolation of *Beauveria bassiana* (ATCC MYA-4886) and *Trichoderma lignorum* (ATCC 8751), through cultivation YPDA and was conducted identifying fungal imprint and biochemical tests. Developing five formulations with ratios of 1:1, 6:4, 4:6, 3:7, 2:8 of *Beauveria bassiana* and *Trichoderma lignorum* respectively, they underwent the test of viability in nutrient agar, pathogenicity by immersion test and proof of purity; the tests were performed in triplicate. **R.** The formulations presented viability to 24 h 95% 2, 100% of the formulations were pure after 10 days, formulations 6,4, 1:1, 2:8 infected all of the individuals in 6 days, formulations 4:6 and 3:7-8 days of exposure. **C.** Formulations 6,4, 1:1, 2:8 of *Beauveria bassiana* and *Trichoderma lignorum*, present infectious activity on the Leaf cutting Ant (*Atta cephalotes*) in laboratory.

### KEYWORDS

Fungi entomopathogenic, biological control, Leaf cutting ant, *Beauveria bassiana*, *Trichoderma lignorum*

## Bioformulação de *Beauveria bassiana* (ATCC MYA-4886) e *Trichoderma lignorum* (ATCC-8751) como biocontrolador de *Atta cephalotes*

### RESUMO

I. O formigueiro está associado a perdas no setor agrícola, devido à sua atividade desfolhadora. O controle das espécies tem sido realizado artesanalmente, quimicamente e biologicamente, este último com benefícios ambientais e baixo risco para a saúde humana. O objetivo desta pesquisa foi desenvolver uma formulação biológica para o controle de formigas (*Atta cephalotes*) usando uma mistura de esporos de dois fungos filamentosos (*Beauveria bassiana* e *Trichoderma lignorum*). **M.** 5 As formulações foram desenvolvidas usando a relação: 1:1, 6:4, 4:6, 3:7, 2:8 estirpes de *B. bassiana* (ATCC MAA-4886) e *T. lignorum* (ATCC 8751), realizá-ndoles Teste de viabilidade, patogenicidade e pureza. A colonização dos esporos nos tecidos foi avaliada pela exposição de ratos Wistar à formulação e seus componentes, realizando diagnóstico veterinário (dissecção) e cultura microbiológica. **R.** As formulações mostraram viabilidade em 24 h de 95 + 2%, 100% das formulações não foram contaminadas após 10 dias, as formulações 6,4, 1:1, 2:8 infectaram todos os indivíduos em 6 dias, as formulações 4:6 e 3:7 aos 8 dias, nenhuma colonização das cepas foi observada na formulação, nem nos tecidos dos biomodelos. **C.** As formulações 6,4, 1:1, 2:8 de *Beauveria bassiana* e *Trichoderma lignorum*, apresentam maior atividade infecciosa sobre os antirretera (*Atta cephalotes*).

### PALAVRAS-CHAVE

Fungo entomopatogênico, controle biológico, arriera formiga, *Beauveria bassiana*, *Trichoderma lignorum*

## Introducción

La hormiga arriera *Atta cephalotes* (Linnaeus, 1758), se encuentra distribuida desde el norte de Argentina hasta la zona central de Texas. En Colombia se reporta su presencia en la región Pacífica y Andina. Por su actividad defoliadora afecta cultivos como: algodón (*Gossypium L.*), cacao (*Theobroma cacao L.*), yuca (*Manihot esculenta Crantz*), maíz (*Zea mays L.*), caucho (*Hevea brasiliensis Mull. Arg.*), caña de azúcar (*Saccharum officinarum L.*) y cítricos (Britto *et al.*, 2016; Fernández, Castro-Huertas, & Serna, 2015) es considerada un especie plaga, estimándose que pueden consumir entre 50 y 150 kg de material vegetal por día. Adicionalmente se ha reportado el daño a edificaciones y carreteras por la desestabilización de los suelos a causa de la remoción de tierra en la construcción de hormigueros. (Zanetti *et al.*, 2014)

Entre los métodos de control de la hormiga arriera, se encuentran los métodos mecánicos, químicos y biológicos. El control mecánico consiste en remoción de los hormigueros con la extracción de la hormiga reina y destrucción de las cámaras de cría, este método presenta una afectividad de aproximadamente 30% (Zanetti *et al.*, 2014). El control químico se fundamenta en la aplicación de insecticidas, que generalmente tienen como componentes activos sulfluramida, fipronil, deltametrina, cloporifos y fenitrotión, los cuales pueden presentar riesgos para la salud humana (Dominah, McMinimy, Kallon, & Kwakye, 2017; Villar *et al.*, 2016), por su bio-concentración, bio-acumulación y bio-magnificación en el ecosistema (Michel *et al.*, 2016; Qu, Ma, Liu, Gao, *et al.*, 2016; Qu, Ma, Liu, Jing, *et al.*, 2016) o asociados al desarrollo de resistencia en plagas de impacto económico como las garrapatas (*Rhipicephalus (Boophilus) microplus*) (Villar *et al.*, 2016), ácaros (*Phenacoccus solenopsis*) (Ejaz *et al.*, 2017) y la hormiga de fuego (*Solenopsis invicta*) (Zhang *et al.*, 2016), en algunos casos su aplicación se realiza por nebulización térmica, lo cual incrementa la contaminación, trazas en el suelo y no logra afectar la totalidad de las hormigas presentes en el hormiguero. Entre los métodos biológicos se encuentran la aplicación de extractos vegetales (Diaz Napal *et al.*, 2015; Morais *et al.*, 2015) y el empleo de cultivos trampa (Stenberg, Heil, Åhman, & Björkman, 2015) los cuales reducen temporalmente la población del hormiguero sin acabarlo definitivamente; por lo que se recomienda el acompañamiento de otros mecanismos de control para garantizar la efectividad (Zanetti *et al.*, 2014). Por todo lo anteriormente mencionado el uso de controles biológicos en la agricultura ha ido creciendo continuamente, dentro de estos se ha utilizado cada vez más biocontroles compuestos por esporas de hongos filamentosos como es el caso de *B. bassiana*; cuyas esporas atacan al insecto plaga (hormiga arriera) y *Trichoderma sp.* que se caracteriza no solo por atacar el insecto sino también por parasitar otras especies

fúngicas que afectan a cultivos agroindustrialmente importantes (Lacey, 2017).

Debido al impacto negativo de la hormiga arriera en la seguridad alimentaria, así como el impacto en la economía de la región y el país, se hizo necesario desarrollar y evaluar la capacidad de un bioinsecticida compuesto por esporas de *B. Bassiana* (ATCC MYA-4886) y *T. lignorum* (ATCC 8751), para el control de la hormiga arriera (*Atta cephalotes*) en condiciones de laboratorio, y el potencial riesgo asociado a la exposición del bioinsecticida por los manipuladores y agricultores que lo utilizan.

Los bioinsecticidas desarrollados a partir de hongos filamentosos se convierten en una de las principales estrategias de control de insectos. En el caso aquí expuesto la utilización de los dos hongos filamentosos anteriormente mencionados en una formulación es un desarrollo que permite al agricultor utilizar productos eficaces contra las plagas agrícolas (hormiga arriera) de forma que no haya un impacto negativo sobre el medio ambiente y sobre la salud humana, minimizando al mismo tiempo el uso de agroquímicos que poseen un fuerte impacto negativo medioambiental y conlleva riesgos en la salud cuando se utiliza. Esta formulación recibió una patente de invención por la superintendencia de industria y comercio de la república de Colombia y se registró una nueva patente en la república de Argentina.

## I. Metodología

En esta investigación se emplearon cepas de *Beauveria bassiana* (ATCC MYA-4886) y *Trichoderma lignorum* (ATCC 8751), crecidas en medio PDA (agar papa dextrosa) incubadas a  $28 \pm 1^\circ\text{C}$ , durante 5 días. Las esporas se colectaron por raspado de la superficie y posterior filtrado, depositándolas en 500mL de YPD (extracto de levadura - peptona - dextrosa), y ajustando a  $1 \times 10^6$  esporas/mL empleando un hemocitómetro Neubauer, (Greenfield *et al.*, 2016). En un fermentador (BIOSTAT® B) se colocó el inóculo en 4L de YPD, para su crecimiento durante 4 días, a 20 rpm de agitación,  $30^\circ\text{C}$  y pH 5.4 (Jirakkakul *et al.*, 2017; Miranda-Hernández, Angel-Cuapio, & Loera-Corral, 2017). Finalizado el crecimiento se prosiguió a la corroboración de las especies fúngicas crecidas y al posterior conteo de esporas.

Se desarrollaron cinco formulaciones con relaciones de 1:1, 6:4, 4:6, 3:7, 2:8 de *Beauveria bassiana* y *Trichoderma lignorum* respectivamente (Formulaciones A, B, C, D y E) donde la concentración inicial fue  $1 \times 10^9$  esporas/mL de cada uno de los hongos. Se evaluó la pureza, viabilidad, pH y patogenicidad de cada una de las formulaciones experimentales.

- Pruebas de viabilidad y pureza de las formulaciones experimentales

Con la prueba de viabilidad se determinó el número de esporas viables, para esto se depositó en medio agar-agar (5 mL y 100  $\mu$ L en caja petri y cubreobjetos respectivamente), diluciones de 1:4 y 1:20 de cada formulación y se incubaron a 30°C por 24 h, seguidamente se tiñó con azul de lactofenol, y se observó a 40X. La viabilidad se determinó como la relación entre las esporas germinadas por cada 100 esporas, cada conteo se realizó por triplicado (Faria, Lopes, Souza, & Wraight, 2015).

Con la prueba de pureza se determinó y evaluó la existencia de organismos contaminantes en las formulaciones, estas se ajustaron a  $1 \times 10^2$  esporas/ $\mu$ L, depositando 100  $\mu$ L en cajas petri con PDA y AN (agar papa dextrosa y agar nutritivo) e incubaron por 10 días a 30°C, evaluando diariamente la presencia de colonias de organismos contaminantes. El porcentaje de pureza se determinó como la relación entre las unidades formadoras de colonias de los microorganismos contaminantes y las unidades formadoras de colonia de las especies fúngicas del insecticida por 100. En todas las formulaciones se determinó el pH, tomando 1 mL de la formulación y se depositandole en 9 mL de agua ultrapura estéril y luego se prosiguió a cuantificar el valor de pH.

Para el desarrollo de la prueba de patogenicidad se colectaron 30 individuos de *Atta cephalotes* por cada formulación, en los hormigueros presentes en el campus universitario (3° 20' Norte, 75° 32' Oeste); seguidamente se trasladaron al laboratorio donde cada individuo se desinfecto y fue sumergido por 30s en cada una de las formulaciones, retirando el exceso con papel absorbente, y depositándolos en frascos estériles a 28°C y humedad relativa del 80%. Se empleó como solución de inmersión negativa con agua estéril (Sun et al., 2013). Se registró diariamente la muerte de individuos y el crecimiento fúngico.

- Pruebas de colonización en murinos

Esta prueba se llevó a cabo en el bioterio de la Universidad ICESI-Cali, durante 32 días, donde 20 (4 por cada tratamiento) ratas Wistar (machos) de 12 semanas de edad, fueron sometidos a 5 tratamientos que correspondieron a: 1) esporas de *T. lignorum* ( $2 \times 10^6$  esporas/g); 2) esporas de *B. bassiana*; 3) esporas de *T. lignorum* (ATCC 8751), y *B. bassiana* (ATCC MYA-4886); 4) esporas de *T. lignorum*, y *B. bassiana*, aisladas de Mycobac y Mycontrol® SE, cada tratamiento a una concentración de  $2 \times 10^6$  esporas/mL y como control negativo agua estéril. La exposición se realizó durante 6 horas, los días 1 y 16, monitoreando el comporta-

miento y peso cada 72 h, manteniéndose a 16.5°C y 55% de humedad relativa, hasta el sacrificio (día 32).

El sacrificio se efectuó mediante la aplicación de 1,5 mL de Euthanex vía intraperitoneal, según protocolo del bioterio. El diagnóstico veterinario se realizó mediante disección y observación macroscópica. Los pulmones de biomodelos fueron almacenados en solución salina 0.89%, y procesados en el laboratorio de investigaciones de la Universidad de San Buenaventura- Cali. La colonización de estos tejidos se evaluó mediante la homogenización por 15s (homogenizador de tejidos, *Omni International, Kennesaw, GA*) y siembra de 10  $\mu$ L por triplicado en medio YPDA (Difco™), incubando a 28°C (*Thermo Scientific, Heratherm IGS180*) durante 7 días, (Bandh, Kamili, Ganai, & Lone, 2016) se identificaron las especies fúngicas morfológicamente hasta el nivel de género.

- Aspectos éticos

Para la ejecución de la investigación se contó con el aval ético Ing7115, otorgado por el comité de ética de la investigación de la Universidad de San buenaventura-Cali. Aval del comité de ética animal CIECUAE de la universidad ICESI no 0023 del 2017.

## 2. Resultados

La prueba de viabilidad en caja de Petri mostró crecimiento a 24 y 48 horas de la totalidad de las formulaciones, en sus diferentes diluciones 1:20, 1:4 y formulación pura. No se observó crecimiento en la caja designada como control (Figura 1)

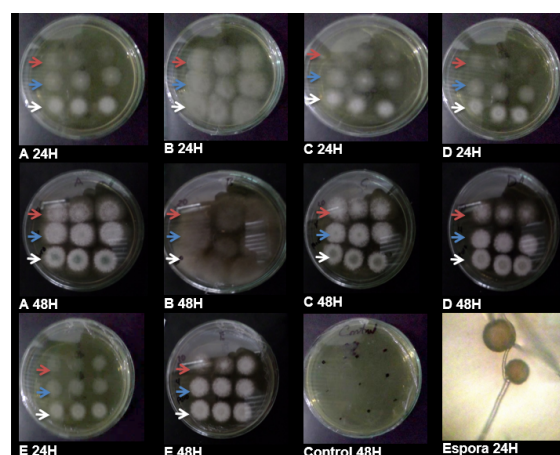


Figura 1. Prueba de viabilidad de las formulaciones de bioinsecticidas evaluadas.

Fuente: Los autores, 2018.

En la Figura 1, las formulaciones se designan con las letras de la A hasta la E, en éstas se observa el crecimiento de las diluciones 1:20 (flecha roja), 1:4 (flecha azul), y formulación



pura (flecha blanca) a 24 y 48 horas; adicionalmente se observa la placa control (los puntos negros corresponden a los lugares de siembra) y la viabilidad de las esporas a 40X, donde se puede identificar la germinación de la espora y el crecimiento de la hifa.

Las esporas contenidas en la formulación presentaron viabilidad de 90 a 92%, donde la mayor viabilidad se observó en las esporas contenidas en la formulación B. No se registró crecimiento de organismos diferentes a *B. bassiana* y *T. lignorum*, en las pruebas de pureza de las soluciones de esporas individuales, a partir de las cuales se realizaron las diferentes formulaciones. Resultados similares fueron observados al evaluar la pureza de cada una de las formulaciones. Según la relación de los hongos se observó el crecimiento mayor o menor de una especie en particular, un caso es la formulación B, en la cual se observa la dominancia de la especie *T. lignorum* y pequeños bordes asociados a *B. bassiana*, los cuales se redujeron proporcionalmente a la relación de *T. Lignorum* en las formulaciones. Las formulaciones que presentaron mayor patogenicidad, medida como la muerte de la totalidad de los individuos en menor tiempo fueron las formulaciones A y B, seguidas en el orden por la formulación E, D y C, donde se observó la muerte de la totalidad de las hormigas a los días 8, 9, y 10 respectivamente (Figura 2).

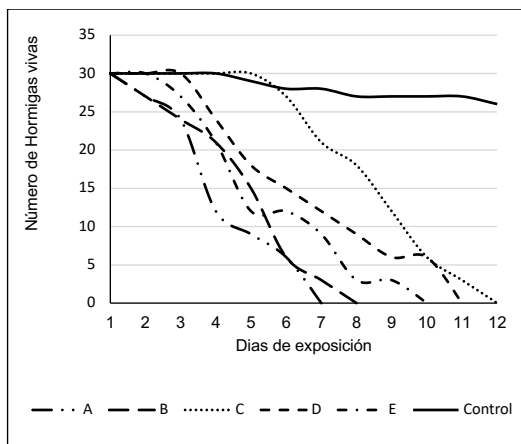


Figura 2. Prueba de patogenicidad en laboratorio. Fuente: Los autores, 2018

En la Figura 2, las letras corresponden a las formulaciones evaluadas. Las formulaciones A-E mostraron crecimiento fúngico del 100%, el control empleado no registro crecimiento.

Todos los individuos se dejaron en medio humedecido hasta observar el crecimiento fúngico (Figura 3), este se presentó en la totalidad de las hormigas expuestas a las diferentes formulaciones.



Figura 3. Prueba de patogenicidad de las formulaciones. Fuente: Los autores, 2018

En la Figura 3, se observa el crecimiento fúngico (flechas azules), en hormigas tras la exposición a cada una de las formulaciones (letras en recuadro).

En cuanto a la evaluación del bioinsecticida en ratas Wistar, no se evidenciaron alteraciones en comportamiento, y en el peso (g) de los individuos en los grupos evaluados (Figura 4).

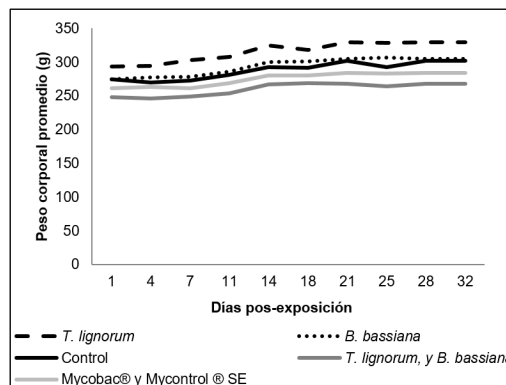


Figura 4. Comportamiento de peso promedio de los biomodelos durante la experimentación. Fuente: Los autores, 2018

A nivel fisiológico se observó que el 75% y 50% de los sujetos expuestos a los tratamientos 2 y 4, presentaron alteraciones, a nivel de pulmón y uno de ellos en hígado (4). En pulmón se observó coloración blanca puntiforme, y presencia de focos hemorrágicos en un individuo, en el hígado se identificó necrosis (Figura 5).

En la Figura 5, las letras A, B, C corresponden a lóbulos pulmonares de los individuos número 6,5,13 en los cuales las flechas señalan marcas puntiformes de color blanco, como diagnóstico macroscópico una posible infección micótica o bacteriana; las letras D, E y F, señala adicionalmente lesiones hemorragias en lóbulos pulmonares y posible lesión necrótica en hígado en los individuos 16 y 7, respectivamente.

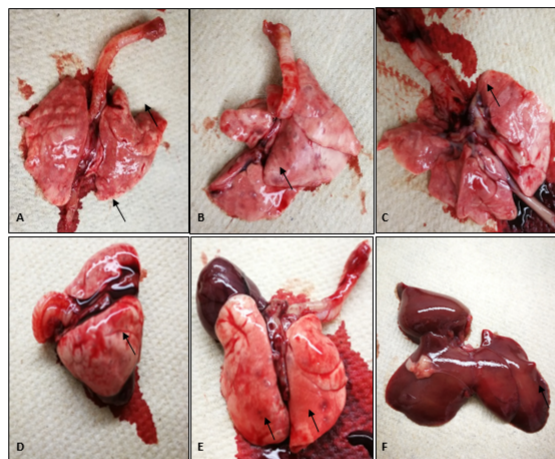


Figura 5. Diagnóstico veterinario

Fuente: Los autores, 2018

Los análisis de microbiología mostraron la presencia de levaduras en las muestras de todos los grupos, bacterias en el 25% de biomodelos de tratamiento 2, y hongos en el 25% de los individuos del grupo 2, 4 y 5, respectivamente (Tabla 1).

### 3. Discusión y conclusiones

En el presente estudio de laboratorio, se demostró que el tratamiento con una formulación que contiene conidias de *B. bassiana* y *T. lignorum*, presenta actividad insecticida en *A. cephalotes*, con la capacidad de ser considerado como una herramienta de control para esta plaga agrícola. Las diferentes formulaciones evaluadas presentaron letalidad en los individuos, encontrándose diferencias en el tiempo de muerte de los individuos, donde el menor tiempo correspondió a la relación de 1:1 de las conidias de ambos hongos filamentosos, incrementándose el tiempo de eliminación del insecto a mayor relación de esporas de *B. bassiana* respecto a *T. lignorum*. A pesar de esto es este hongo entomopatógeno (*B. bassiana*) el que a partir de la literatura especializada aparece relacionado y probado como agente control de diferentes artrópodos considerados plaga (Andreadis *et al.*, 2016; Ullah & Lim, 2017) y donde la infección en esta especie está mediada por la adhesión de la conidia al exoesqueleto, seguido por la formación de túbulo germinal, la degradación de la cutícula, la colonización del hemocele evadiendo el sistema inmune, donde segrega toxinas y se alimenta de la

Tabla 1.  
Evaluación de colonización fúngica en biomodelos (ratas Wistar).

T	In.	Exposición	DX VET	DX microbiología		
				H	L	B
1		<i>T. lignorum</i>	S	-	-	-
1	2		S	-	-	-
	3		S	-	-	-
	4		S	-	+	-
	5	<i>B. bassiana</i>	E	+	-	-
2	6		E	-	-	+
	7		E	-	+	-
	8		S	-	+	-
	9	<i>T. lignorum</i> , y <i>B. bassiana</i>	S	-	-	-
3	10		S	-	+	-
	11		S	-	-	-
	12		S	-	-	-
	13	<i>Mycobac</i> y <i>Mycontrol</i> ® SE *	E	+	+	-
4	14		S	-	+	-
	15		S	-	-	-
	16		E	-	-	-
	17	<i>Control</i> *	S	-	+	-
5	18		S	+	+	-
	19		So	-	-	-

Fuente: Elaboración propia

**Nota:** Uno de los biomodelos de este grupo fue eliminado del análisis, por presentar muerte repentina, no asociada a la exposición. En la tabla T= tratamiento, in= individuos, Dx Vet= diagnóstico veterinario, S=sano, E=enfermo, + = presencia y - =ausencia.

hemolinfa hasta finalmente producir la muerte del anfitrión, del cual emerge (Valero-Jiménez *et al.*, 2016). Esto difiere considerablemente de la acción de *T. lignorum* el cual produce toxinas que en general propenden por la destrucción de los esclerocios produciendo la muerte de hongos, por lo cual ha sido empleado como control de hongos patógenos (Al-Hazmi & Tariqjaveed, 2016). Estas diferencias permitirán esperar la infección y muerte de los individuos en rangos de tiempo más cortos. Si bien la infección de artrópodos por *T. lignorum* no se encuentra reportada, existen casos de infección por *Trichoderma longibrachiatum* (Ghosh & Pal, 2016), por lo cual es posible que otras especies pertenecientes a este género puedan parasitar insectos, como se observó en el presente estudio.

La reducción en el periodo de muerte de los individuos y su relación inversa con la concentración de *B. bassiana*, se puede explicar por un efecto aditivo durante la infección fúngica, donde la colonización por *B. bassiana* permitirá la exposición del hemocele y la entrada de *T. lignorum*, que incrementaría la concentración de toxinas, o la pérdida de nutrientes en el huésped y conduciría a una muerte más temprana. Otra posible explicación se encontraría explicada por la infección inicial del huésped por *B. bassiana*, al establecerse esta infección, la especie puede ser empleada como sustrato por *T. lignorum*, el cual la parasitaría, de esta forma puede ingresar al hemocele del insecto y así continuar con la infección en el individuo. Ambas hipótesis requieren de estudios más precisos. A pesar de esto, se puede resaltar la obtención de ambas especies a partir de los individuos infectados, adicionalmente al cultivar las formulaciones en medio PDA se observó un crecimiento inicial de la especie *B. bassiana* seguido por la colonización de *T. lignorum*, donde este último, después de 15 días, se convertía en la única especie fúngica presente, lo cual sigue una infección secuencial en los individuos.

La característica dual de las formulaciones evaluadas se fundamenta en el control de la *A. cephalotes*, empleando una reducción en el número de individuos, la cual está mediada por la actividad de *B. bassiana*, así mismo la reducción en la fuente alimenticia mediante la infección del hongo simbiote. Los resultados observados en laboratorio sugieren que estas formulaciones pueden ser empleadas en el control de *A. cephalotes*. A pesar de esto se requieren estudios de campo, donde las condiciones ambientales permitan establecer la efectividad de estas.

Los análisis fisiológicos y el cultivo microbiológico, mostraron que la exposición aérea de los manipuladores del bioinsecticida sin contacto no permite la introducción de esporas al organismo, así mismo no se afecta el comportamiento y ganancia de peso de los biomodelos; estudios similares concuerdan en que la inoculación de esporas de *B.*

*bassiana* por vía respiratoria en animales sanos, no genera aparición de patologías (Perfetti, Quintero, & Moreno, 2015), por lo cual los resultados del estudio confirmarían estas observaciones. A pesar de esto hasta la fecha se conoce de 10 reportes de infecciones en humanos, donde en algunos casos se comporta como patógeno oportunista (Lara Oya *et al.*, 2016; Ogawa, Matsumoto, Yaguchi, Shimmura, & Tsubota, 2016) respecto a *T. lignorum*. En esta investigación no se observaron alteraciones patológicas en los biomodelos de experimentación, y no se aislaron los hongos entomopatógenos a partir de los cultivos de los tejidos, esto confirma la incapacidad de infección por estas esporas a pesar de presentarse en prestación líquida y en polvo sin inoculación directa. En los caso de infección la literatura especializada reporta que se caracterizan por lesiones en hígado, sin afectaciones pulmonares y recuperación del hongo mediante el cultivo (Vargas & Dussan, 2002), aspectos negativos en este estudio, así mismo la infección de cepas de este género se observa en individuos inmunocomprometidos (Tascini *et al.*, 2016; Vargas & Dussan, 2002).

## Agradecimientos

Por el apoyo financiero de INNPULSA-Colciencias; el apoyo de Colciencias para la financiación de las fases posteriores del proyecto en la actualidad bajo el contrato mercantil No. 3-1-44842 (2014-0401 COLCIENCIAS), contrato 025-2016, a la Institución Universitaria Antonio José Camacho (Resolución 588 de agosto 17 de 2016) y a la Universidad de San Buenaventura, Cali.

## Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

## Referencias bibliográficas

1. AL-HAZMI, Ahmad S, & TARIQJAVEED, Muhammad. Effects of different inoculum densities of *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma viride* against *Meloidogyne javanica* on tomato. In: Saudi Journal of Biological Sciences. 2016. vol. 23. no. 2. p. 288-292 <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2015.04.007>
2. ANDREADIS, Stefanos, *et al.* Efficacy of *Beauveria bassiana* formulations against the fungus gnat *Lycoriella ingenua*. In: Biological Control. 2016. vol. 103. p. 165-171. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2016.09.003>
3. BANDH, Suhaib, *et al.* Opportunistic fungi in lake water and fungal infections in associated human population in Dal Lake, Kashmir. In: Microbial Pathogenesis. 2016. vol. 93. p. 105-110. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2016.01.022>

4. DIAZ, Georgina, et al. Screening of native plants from central Argentina against the leaf-cutting ant *Acromyrmex lundi* (Guérin) and its symbiotic fungus. In: *Industrial Crops and Products*. 2015. vol. 76. p. 275–280 <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.07.001>
5. DOMINAH, Gifty, et al. Acute exposure to chlorpyrifos caused NADPH oxidase mediated oxidative stress and neurotoxicity in a striatal cell model of Huntington's disease. In: *Neurotoxicology*. 2017. vol. 60. 54–69 <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2017.03.004>
6. EJAZ, Masood, et al. Laboratory selection of chlorpyrifos resistance in an Invasive Pest, *Phenacoccus solenopsis* (Homoptera: Pseudococcidae): Cross-resistance, stability and fitness cost. In: *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 2017. vol. 137. p. 8–14 <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2016.09.001>
7. FARIA, Marcos, et al. Conidial vigor vs. viability as predictors of virulence of entomopathogenic fungi. In: *Journal of Invertebrate Pathology*. 2015. vol. 125. p. 68–72. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2014.12.012>
8. FERNÁNDEZ, Fernando; CASTRO, Valentina y SERNA, Francisco. Hormigas cortadoras de hojas de Colombia: *Acromyrmex* & *Atta* (Hymenoptera: Formicidae). 1 ed. Fauna de Colombia. 2015. 253p. ISBN: 9789587752571
9. FREESE, Marko, et al. Fipronil and two of its transformation products in water and European eel from the river Elbe. In: *Science of The Total Environment*. 2016. vol. 568. p. 171–179. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.05.210>
10. GREENFIELD, Melinda, et al. *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* endophytically colonize cassava roots following soil drench inoculation. In: *Biological Control*. 2016. vol. 95. p. 40–48. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2016.01.002>
11. GHOSH, Swapn & PAL, Sujoy. Entomopathogenic potential of *Trichoderma longibrachiatum* and its comparative evaluation with malathion against the insect pest *Leucinodes orbonalis*. In: *Environmental Monitoring and Assessment*. 2016. vol. 188. no. 1. p. 1–37. <https://doi.org/10.1007/s10661-015-5053-x>
12. JIRAKKAKUL, Jiraporn, et al. Culture degeneration in conidia of *Beauveria bassiana* and virulence determinants by proteomics. *Fun- gual Biology*. 2017. vol. 122. no. 2-3. p. 156–171 <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2017.12.010>
13. LACEY, Lawrence. Chapter 1 - Entomopathogens Used as Microbial Control Agents BT - *Microbial Control of Insect and Mite Pests*. In: *Microbial Control of Insect and Mite Pests From Theory to Practice*. Academic Press; 2017. p. 3–1215 .ISBN: 9780128035276
14. LARA, Ana, et al. Fungal Keratitis Due to *Beauveria bassiana* in a Contact Lenses Wearer and Review of Published Reports. In: *Mycopathologia*. 2016. vol. 181. no. 9–10. p. 745–752. <https://doi.org/10.1007/s11046-016-0027-2>
15. MORAIS, Wagner, et al. Extracts of *Ageratum conyzoides*, *Coriandrum sativum* and *Mentha piperita* inhibit the growth of the symbiotic fungus of leaf-cutting ants. In: *Industrial Crops and Products*. 2015. vol. 65. p. 463–466 <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.10.054>
16. MIRANDA-HERNÁNDEZ, Francisco; ANGEL-CUAPIO Alejandro y LOERA-CORRAL, Octavio. 33 - Production of Fungal Spores for Biological Control. In: *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering*. Elsevier; 2017. p. 757–79. ISBN: 978-0-444-63662-1
17. OGAWA, Akiko, et al. Successful treatment of *Beauveria bassiana* fungal keratitis with topical voriconazole. *Journal of Infection Chemotherapy*. 2016. vol. 22. no. 4. p. 257–260. <https://doi.org/10.1016/j.jiac.2015.10.008>
18. PERFETTI, Dalmiro C; QUINTERO María A, y MORENO, Pedro M.. Evaluación de la Patogenicidad Inhalatoria del Micoinsecticida *Beauveria bassiana* LF14 en Ratones. In: *Revista De Investigaciones Veterinarias Del Perú*. 2015. vol. 26. no. 4. p. 565–576. <https://doi.org/10.15381/rirep.v26i4.11213>
19. QU, Han, et al. Environmental behavior of the chiral insecticide fipronil: Enantioselective toxicity, distribution and transformation in aquatic ecosystem. In: *Water Research*. 2016. vol. 105. p. 138–146 <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.08.063>
20. QU, Han, et al. The toxicity, bioaccumulation, elimination, conversion of the enantiomers of fipronil in *Anodonta woodiana*. In *Journal of Hazardous Materials*. 2016. vol. 312. p. 169–174. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.03.063>
21. SÉRGIO DE BRITTO, Julio, et al. Use of alternatives to PFOS, its salts and PFOSF for the control of leaf-cutting ants *Atta* and *Acromyrmex*. In: *International Journal of Research in Environmental Studies*. 2016. vol. 3.p. 11–92 [http://www.bluepenjournals.org/ijres/pdf/2016/May/de\\_Britto\\_et\\_al.pdf](http://www.bluepenjournals.org/ijres/pdf/2016/May/de_Britto_et_al.pdf)
22. STENBERG, Johan, et al. Optimizing Crops for Biocontrol of Pests and Disease. In: *Trends Plant Science*. 2015. vol. 20. no. 11. p. 698–712. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2015.08.007>
23. SUN, Min, et al. Effectiveness of *Beauveria bassiana* sensu lato strains for biological control against *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* (Acari: Ixodidae) in China. In: *Parasitology International*. 2013. vol. 62. no. 5. p. 412–415. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2013.04.008>
24. TASCINI, Carlo, et al. First Case of *Trichoderma longibrachiatum* CIED (Cardiac Implantable Electronic Device)-Associated Endocarditis in a Non-immunocompromised Host: Biofilm Removal and Diagnostic Problems in the Light of the Current Literature. In: *Mycopathologia*. 2016. vol. 128. no. 3-4. p. 297–303. <https://doi.org/10.1007/s11046-015-9961-7>
25. ULLAH ,Mohammad S & Un Taek, Lim. Laboratory evaluation of the effect of *Beauveria bassiana* on the predatory mite *Phytoseiulus persimilis* (Acari: Phytoseiidae). In: *Journal of Invertebrate Pathology*. 2017. vol. 148. p. 102–109. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2017.06.006>
26. VALERO-JIMÉNEZ, Claudio, et al. Genes involved in virulence of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. In: *Journal of Invertebrate Pathology*. 2016. vol. 133. p. 41–49. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2015.11.011>
27. VARGAS, Marleny y DUSSÁN, Jenny. Bioseguridad de cepas nativas del hongo *Trichoderma spp.* utilizadas en control biológico. In:



- Actualidades biológicas. 2002. vol. 24. no. 76. p. 37–48. <https://doi.org/10.17533/udea.acbi>
28. VILLAR David, *et al.* In vitro resistance to topical acaricides of the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* from four regions of Colombia. In: CES MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA. 2016. Vol. 11, no 3. P. 58-70 <http://www.scielo.org.co/pdf/cmzv/v11n3/v11n3a07.pdf>
  29. ZANETTI, Ronald, *et al.* An Overview of Integrated Management of Leaf-Cutting Ants (*Hymenoptera: Formicidae*) in Brazilian Forest Plantations. In: Forests. 2014. vol. 5, no. 3. p. 439–54. <https://doi.org/10.3390/f5030439>
  30. ZHANG, Bai-zhong, *et al.* Insecticide induction of O-demethylase activity and expression of cytochrome P450 genes in the red imported fire ant (*Solenopsis invicta* Buren). In: Journal of Integrative Agriculture. 2016. vol. 15. no. 1. p. 135–144. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(15\)61072-3](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(15)61072-3)